

532579

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際特許願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/039965 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 5/02, 5/06 (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014009
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 31 日 (31.10.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-318052 31 Apr 05  
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 丹羽 仁史 (NIWA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒634-0114 奈良県 高市郡 明日香村 細川 6 8 9 Nara (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小川 和也 (OGAWA, Kazuya) [JP/JP]; 〒651-0096 兵庫県 神戸市 中央区雲井通 3-1-6 Hyogo (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION FOR CULTURING MULTIPOTENT STEM CELLS AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞培養用の組成物とその使用

(57) Abstract: It is aimed to culture multipotent stem cells in a medium without using serum or supporting cells to thereby proliferate or establish undifferentiated multipotent stem cells sustaining the differentiation ability. This object can be achieved by preparing a medium, in which multipotent stem cells are to be cultured, exclusively using apparent components supplemented with an adenylate cyclase activity inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞を、血清や支持細胞を用いることのない培地で培養し、分化能を保持した未分化多能性幹細胞を増殖又は樹立させることを課題とする。本課題は、多能性幹細胞を培養する培地を、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を補充した、明らかな成分のみから構成することにより解決される。

WO 2004/039965 A1

## 明 細 書

## 多能性幹細胞培養用の組成物とその使用

## 5 技術分野

本発明は、多能性幹細胞培養用の組成物とその使用、特に支持細胞や血清が存在しない培地における多能性幹細胞の培養を可能にする組成物及びこれを含有する培地並びにそれらの使用に関する。

## 10 背景技術

多能性幹細胞は、少なくともそれぞれ1種類ずつの外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する分化細胞に分化する能力を有する自己複製可能な幹細胞であり、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: E S細胞)、胚性生殖細胞 (embryonic germ cell: E G細胞)、胚性癌細胞 (embryonal carcinoma cell: E C細胞)、多能性成体前駆細胞 (multipotent adult progenitor cells: M A P細胞)、成体多能性幹細胞 (adult pluripotent stem cell: A P S細胞) などを包含する。以下、これらのうちE S細胞を例に挙げて、本発明を詳細に説明する。

E S細胞は、初期胚に存在する多能性幹細胞集団に由来する細胞株であって、生殖細胞を含む種々の細胞に分化する能力を有しており、特定の培養条件下で多能性を維持したまま増殖させることができる。このような条件下で培養されたE S細胞を胚盤胞又は桑実胚に注入すると、キメラ動物 (2種の異なるゲノムを有する動物) が生成される。遺伝子操作されたE S細胞に由来する生殖細胞を有するキメラ動物を交配することにより、操作された遺伝子を持つ動物個体を作成することができる。このため、E S細胞は、ノックアウトマウス (特定遺伝子の機能が改変されたマウス) を含むトランスジェニック動物の作成に広く用いられている。また、シャーレ内でE S細胞を分化誘導して特定の分化細胞を得る技術も開発されている。この技術をヒトE S細胞に適用することにより、細胞移植治療に必要な分化細胞が得られることから、将来的には医療の分野におけるE S細胞の利用も期待されている。

以上のように、E S細胞を分化させることなく、多能性（分化能）を保持したまま増殖又は樹立させる培養技術は、既に開発されている。すなわち、E S細胞を培養する培地には、通常、血清（例えば、ウシ胎児血清（fetal calf serum: FCS）、ウマ血清、ヤギ血清）を添加する。血清はE S細胞の分化を抑制し、  
5 増殖又は樹立を促進する種々の液性因子を供給するものであるが、これらの因子は現在まで同定されていない。また、血清はロット間の変動が大きいので、多大な労力を要する予備スクリーニングによって、適切なものを選別する必要がある。

また、別の培養技術として、E S細胞は、不活性化して増殖を停止させた胎児性初代培養線維芽細胞やS T O細胞などを支持細胞として使用し、その上に植えられ培養されている。この際、支持細胞は、E S細胞付着のためのマトリックスを提供すると共に、E S細胞の分化を抑制し、増殖を促進する種々の液性因子を放出すると考えられている。そのような液性因子の1つとして白血病阻害因子（leukemia inhibitory factor: L I F）が知られており（米国特許第5, 1 8 7, 0 7 7号）、これは様々な動物に由来するE S細胞の分化抑制能を有するところから、多くの場合、血清、支持細胞、L I Fを組合せて使用している。また、血清含有培地に大量の組換えL I Fタンパク質を添加することにより、支持細胞非依存性のE S細胞をゼラチンコートプレート上で培養することも可能とされている（米国特許第5, 1 6 6, 0 6 5号）。

上記したような血清や支持細胞の使用は、ヒトE S細胞に由来する分化細胞を細胞移植治療に応用しようとする際、大きな問題を生じる。すなわち、ヒトE S細胞の培養は、通常、ウシ胎児血清を含む培地を使用して、不活性化したマウス胎児性初代培養線維芽細胞を支持細胞として行なわれてきたが、これら異種動物由来の生体成分は、常に未知病原体の感染源となりうる。また、米国食品医薬局の草案では、異種細胞と共培養されたヒト細胞の移植は異種移植

25 (xenotransplantation) と見なされ、被移植者の生活制限がなされることになる。

従って、E S細胞のような多能性幹細胞の細胞生物学的特性の解析やその医学的応用において、その単離、培養は、異種動物由来の感染源や異種細胞を含まない培地、すなわち支持細胞や血清を含まない、人為的調製が可能な、成分が明ら

かな培地を使用して行うことが望ましいことは明らかである。

このような要望に答えるべく、種々の研究が行われ、提案がなされてきた。その代表例として、血清を含む培地に大量の組換えL I Fタンパク質を添加することにより、支持細胞非依存性のE S細胞をゼラチンコートプレートの上で培養する方法がある（米国特許第5, 1 6 6, 0 6 5号）。また、血清に代えて特定の置換物を含む胚性幹細胞培養用培地（特開2 0 0 1－5 0 8 3 0 2号公報）が提案され、支持細胞の存在下で、血清を含まない培地による培養を可能にしている。しかしながら、大量の組換えL I Fタンパク質を培地に供給しても、血清の代わりに特定の置換物を含む、成分が明らかな培地で支持細胞非依存性のE S細胞をゼラチンコートプレート上で安定に培養することは不可能であった。即ち、従来の技術では、血清の代わりに血清置換物を使用して培養すると、支持細胞非依存性多能性幹細胞であっても、ゼラチンコートプレート上で低密度播種条件で増殖又は樹立させることは不可能であった。

また、E S細胞の樹立や遺伝子操作のためには、低密度播種条件下でさえもE S細胞を増殖させる必要があるが、上記の条件ではその要求を満たさない。

#### 発明の開示

本発明の技術的課題は、このように従来、不可能とされてきた、支持細胞や血清を使用しない、人為的に調製できる成分が明らかな培地による、多能性幹細胞の培養を可能にすることにある。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々研究を重ねた結果、未分化状態を維持させつつ多能性幹細胞を増殖又は樹立させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行なうことにより、上記課題が解決できる事実を見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

「アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件」を作成する最も典型的な具体例は、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を多能性幹細胞の培養培地に添加又は配合することである。これにより当該培地に支持細胞や血清が存在しなくとも、多能性幹細胞を分化させることなく、その分化能を保持したまま、増殖又は樹立することが可能となる。

従って、本発明の主たる目的は、少なくとも1種のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有する、多能性幹細胞培養用の組成物を提供することにある。他の目的は、そのような組成物を含む、多能性幹細胞培養用の培地を提供することにある。さらに他の目的は、そのような培地を使用する、多能性幹細胞の培養方法を提供することにある。さらにまた他の目的は、上記したような培地で培養し、増殖又は樹立された未分化多能性幹細胞を提供することにある。これら及びその他の目的は、当業者にとって、以下に記載する本発明の詳細な説明から明らかとなる。

本発明のある態様では、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の少なくとも1種を含有する、多能性幹細胞培養用の組成物が提供される。本発明の組成物は、場合により培地補充物である。本発明の組成物は、多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ、多能性幹細胞を増殖させるためのものである。好ましくは、該アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質は、SQ 22536（9-（テトラヒドロ-2-フラニル）-アデニン）、2',5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート及びMDL-12,330A（シス-N-（2-フェニルシクロペンチル）アザシクロトリデセ-1-エン-2-アミン）からなる群から選択されるか、又は、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド（PACAP）並びにそれらと実質的に同様の生理活性を有するペプチドから選択される。

本発明の別の態様では、上記のいずれかの組成物を含む、多能性幹細胞培養用の培地が提供される。好ましくは、該培地は、支持細胞及び／又は血清を含まない。さらに好ましくは、該培地は、支持細胞及び血清を含まない。これらの培地は、細胞培養用最小培地であり得、また、さらに分化抑制因子、血清置換物及び抗酸化剤を含むことができる。

本発明のさらなる態様では、多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ、多能性幹細胞を増殖又は樹立するための多能性幹細胞の培養方法であって、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする方法が提供される。好ましくは、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件は、アデニル

酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものである。また、本培養方法は、上記の培地中で行うことができる。

本発明の培養方法では、好ましくは、多能性幹細胞はES細胞である。また、多能性幹細胞は哺乳類由来であり得る。さらに、多能性幹細胞はヒト由来であり得る。

さらに、上記の方法により増殖又は樹立させた、多能性を保持する未分化多能性幹細胞が提供される。

本発明のさらなる態様では、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下に未分化状態の多能性幹細胞を培養することを特徴とする、未分化状態の多能性幹細胞クローン集団の調製方法が提供される。さらに、生体から未分化状態の多能性幹細胞を単離し、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下に未分化状態の多能性幹細胞を培養することを特徴とする、未分化状態の多能性幹細胞クローン集団の調製方法が提供される。好ましくは、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件は、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものである。また、本調製方法における培養は、上記の培地中で行うことができる。

好ましくは、本調製方法は、1個の多能性幹細胞を培養してそのクローン細胞集団を得ることを特徴とする。あるいは、本調製方法は、近接する多能性幹細胞同士の相互作用により当該多能性幹細胞の未分化増殖が誘導されるよりも低密度な播種条件にある多能性幹細胞を、上記の培地で培養してそのクローン集団を得ること、又は、支持細胞及び／又は血清が存在せず、かつ、上記の組成物が存在しない条件下では未分化増殖を起こさない多能性幹細胞を、上記の培地で培養してそのクローン集団を得ることを特徴とする。特に好ましくは、1個の多能性幹細胞を上記の培地で培養してそのクローン集団を得ることを特徴とする。

上記の調製方法では、好ましくは、多能性幹細胞はES細胞である。また、多能性幹細胞は哺乳類由来であり得る。さらに、多能性幹細胞はヒト由来であり得る。

本発明はまた、上記の調製方法で得られる、未分化多能性幹細胞クローン集団を提供する。

本発明の別の態様は、多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ培養し、多能

性幹細胞を増殖又は樹立させるための、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質又はアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有する組成物の使用である。

本発明により、多能性幹細胞を、血清や支持細胞を用いることなく、成分が明らかな培地で培養し、多分化能を保持した未分化多能性幹細胞を増殖又は樹立させることが可能になる。その結果、増殖又は樹立した多能性幹細胞は、血清や支持細胞に由来する病原体によって汚染されることがなく、又、異種細胞との共培養に基づく特別の制限を回避できることとなる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、特定ペプチドの補充による血清及び支持細胞不存在下における未分化 E S 細胞の増殖を示す図（写真）である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「多能性」とは、外胚葉、中胚葉、内胚葉に属するいずれの分化細胞にも分化し得る能力、及び外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する少なくともそれぞれ 1 種の分化細胞に分化する能力を意味し、生殖細胞への分化能も、この概念に包含される。

「多能性幹細胞」とは、外胚葉、中胚葉、内胚葉に属するいずれの分化細胞にも分化し得る能力、又は外胚葉、中胚葉、内胚葉に属する少なくともそれぞれ 1 種類ずつの分化細胞に分化する能力（多分化能）を有する自己複製可能な幹細胞を意味し、E S 細胞、E G 細胞、E C 細胞、MAP 細胞、AP S 細胞などが含まれる。その代表例である「胚性幹細胞（E S 細胞）」は、多分化能を有し、他の胚盤胞中に注入されると、生殖細胞をも含む種々の細胞に分化し得る。

「支持細胞」とは、それ自体は増殖できないが、代謝活性を有しており、種々の代謝物質を産生することにより、その上に植えられた他の細胞の増殖を助ける細胞をいう（村松正実ら：「分子細胞生物学辞典」367 頁（1997 年）

（株）東京化学同人発行参照）。例えば、E S 細胞の場合、不活性化して増殖を停止させた胎児性初代培養繊維芽細胞又は S T O 細胞を支持細胞として使用する。

「支持細胞非依存性多能性幹細胞」とは、血清の存在下、支持細胞を含まない

培養条件で増殖し得る多能性幹細胞を意味する。多能性幹細胞は、本来、そのような培養条件では、未分化増殖培養することが困難なものであるが、継代培養を続けることにより、支持細胞非依存性を取得するようになる。

本発明によって提供される多能性幹細胞培養用の組成物は、少なくとも1種のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有することを特徴とする。アデニル酸シクラーゼは、ATPからcAMP（サイクリックAMP）を生成させる酵素であり、細胞のシグナル伝達における中心的な酵素である。この酵素の活性は、主にGタンパク質共役型受容体を介してさまざまな細胞外シグナルにより調節され、生じるcAMPは細胞内第2メッセンジャーとして働く。哺乳動物では、現在までにヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ウサギなどで、計10種類のアデニル酸シクラーゼの存在が報告されている（例えば、Patel, TB et al., Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function, Gene, 269, 13-25, 2001）。ヒトではこのうち9種類について、マウスでは5種類について遺伝子が単離されているが、マウスで単離されたものは全てヒトでもよく配列が保存されていること、及びこれらの分子が細胞増殖制御などの基本的な生命現象に不可欠であることから、多能性幹細胞におけるアデニル酸シクラーゼの機能もこれらの動物種で共有されていると考えられる。

本発明の多能性幹細胞培養用の組成物として使用するアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質は、細胞内及び細胞外シグナル伝達経路のいずれの段階で作用するものであっても、結果的にアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するものであればよい。従って、例えば、アデニル酸シクラーゼの活性抑制に至る細胞外シグナルを受容体に与える物質や、アデニル酸シクラーゼを直接阻害する物質が使用でき、受容体とアデニル酸シクラーゼとの間のシグナル伝達を媒介する分子に作用する物質も使用できる。

ある物質が多能性幹細胞のアデニル酸シクラーゼの活性を抑制するか否かを調べるためには、増殖又は樹立させようとする細胞（例えばES細胞）の培養培地に当該物質を添加し、cAMP生成の抑制具合を観察すればよい。

アデニル酸シクラーゼを直接阻害する物質の例には、SQ22536（9-（テトラヒドロ-2-フラニル）-アデニン）、2',5'-ジデオキシアデノシ



ン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート、MDL-12,330A (シス-N-(2-フェニルシクロペンチル)アザシクロトリデセ-1-エン-2-アミン)などの化合物が挙げられ、これらはCALBIOCHEM-  
5 NOVABIOCHEM CORPORATION (California, USA) などから市販されており、容易に入手できる。これら物質の使用量は、その種類に応じて適宜に決定されてよい。例えば、SQ22536を使用する場合、その培地中の最終濃度は特に限定されるものではないが、普通、1  $\mu$ M~10 mM、好ましくは10  $\mu$ M~1 mMの最終濃度となるような量で使用する。

- 10 多能性幹細胞においてアデニル酸シクラーゼの活性を抑制する物質の他の例としては、次ぎのようなペプチドを挙げることができる：副腎皮質刺激ホルモン (corticotropin, adrenocorticotrophic hormone: ACTH)、脳ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP)、下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (pituitary adenylate cyclase activating  
15 polypeptide: PACAP) など。

- また、それらペプチドと実質的に同様の生理活性を有するペプチド、すなわち上記ACTH、BNP、PACAPなどのペプチドを構成するアミノ酸配列について一つ又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加しており、対応する完全長ペプチドと同様の生理活性を有するものも使用することができる。例え  
20 ば、ACTHは、39個のアミノ酸から成るペプチド (ACTH (1-39)) であって、N末端1~24のアミノ酸は各動物に共通し、25~33のアミノ酸は種によって相違し、N末端1~18に副腎皮質刺激作用があることが知られているが、本発明においては、ACTH (1-39) に加え、その断片であるACTH (1-24)、ACTH (11-24) など也可以使用することができる。これ  
25 らのペプチドは、普通、1 nM~100  $\mu$ M、好ましくは1~10  $\mu$ Mの最終濃度となるような量で使用する。

上記したACTH、BNP、PACAPなど並びにそれらのフラグメント自体はいずれも文献に記載されているか (例えば、米国特許公報第4,415,546号；今堀和友ら：生化学辞典 (第3版) 1178~1179頁、721頁及び2

86～287頁（1998）（株）東京化学同人）、又は試薬として市販されているか、若しくは文献記載の方法に準じて製造することが可能なものである。例えば、それらペプチドは、所望のアミノ酸配列を構築するための当業者にとって周知の合成法で作成することができる。また、それらペプチドをコードする遺伝子

5 子は大腸菌などの宿主細胞に導入し、ペプチドを発現させ、これを単離、精製する遺伝子操作により製造することもできる。

本発明の組成物は、単一のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含んでもよく、複数のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質をいかなる組合せで含んでもよい。従って、複数の化合物を含む組成物、複数のペプチドを含む組成物、及び化合物と

10 ペプチドの両方を含む組成物などを使用できる。あるいは、本発明の組成物は、単一のアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質のみから構成されてもよい。

本発明により、上記組成物を添加した多能性幹細胞培養用の培養培地が提供される。当該組成物は、支持細胞や血清に由来する液性因子の代替物であるから、培養培地に支持細胞や血清が存在しても多能性幹細胞の培養に支障をきたすもの

15 ではないが、支持細胞や血清が存在すれば、それらに由来する病原体による汚染や、異種移植として特別の制限を回避することができない。従って、好ましくは、培養培地として支持細胞及び／又は血清を含まないものが使用され、より好ましくは、培養培地として支持細胞も血清も含まないものが使用される。

すなわち、本発明の培養培地は、好ましくは細胞培養用最小培地（cell culture minimum medium: C CMM）を基礎培地とし、これに分化抑制因子、血清置換物、抗酸化剤（例えば、2-メルカプトエタノール（2-ME）、ジチオトレイトール、アスコルビン酸）及び上記した本発明の組成物（すなわち、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質）を含有させたものであって、支持細胞や血清を含有しないものである。それらC CMM、分化抑制因子、血清置換物、抗酸化剤

20 及び本発明の組成物は、以下に説明するように、いずれも人為的に調製することの可能な、既知物質であるから、それらによって構成される本発明の培養培地は、生体成分の使用に起因する未知病原体による汚染を回避することができるものである。

基礎培地として使用する「細胞培養用最小培地（C CMM）」は、これに分化

抑制因子、血清置換物、抗酸化剤及び本発明の組成物を含有させた場合、多能性幹細胞の未分化増殖を可能にする任意の培地を意味する。

C CMMには、通常、標準無機塩（亜鉛、鉄、マグネシウム、カルシウム、カリウムなど）、ビタミン、グルコース、緩衝系、必須アミノ酸などを添加する。

5 その具体例としては、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$  Minimal essential Medium ( $\alpha$  MEM), Glasgow's Minimal essential Medium (GMEM), Iscove's Modified Dulbecco's Mediumなどを挙げることができ、市販のものが使用されてもよい。

10 最も好ましいC CMMは、表1の組成のGMEMである。

表1

成分	濃度 (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> (無水)	200.00
Fe (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (無水)	97.67
NaCl	6400.00
NaHCO <sub>3</sub>	2750.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	107.80
D-グルコース	4500.00
フェノールレッド	16.00
L-アルギニン · HCl	42.00
L-システイン · HCl	31.29
L-グルタミン	292.00
L-ヒスチジンHCl · H <sub>2</sub> O	21.00
L-イソロイシン	52.40
L-ロイシン	52.40
L-リジン · HCl	73.10
L-メチオニン	15.00
L-フェニルアラニン	33.00
L-スレオニン	47.60
L-トリプトファン	8.00
L-チロシン · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	52.19
L-バリン	46.80
D-Caパントテン酸	2.00
塩化コリン	2.00
葉酸	2.00

i-イノシトール	3.60
ニアシンアミド	2.00
ピリドキサルHCl	2.00
リボフラビン	0.20
チアミンHCl	2.00

好ましくは、CCMMには、0.1 mM非必須アミノ酸及び1 mM ピルビン酸ナトリウムを加える。非必須アミノ酸はL-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-プロリン、L-セリンの混合物で、例えば MEM non-essential amino acids solution 10 mM liquid

5 (Invitrogen) として市販されているものを使用する。ピルビン酸ナトリウムは、例えば MEM Sodium pyruvate solution 100 mM liquid (Invitrogen) として市販されているものを使用する。

分化抑制因子は、支持細胞及び多能性幹細胞自身が放出する液性因子であり、未分化細胞の分化を抑制する。代表的な分化抑制因子としては、白血病阻害因子

10 (LIF) が挙げられる。分化抑制因子は、元来、生体に存在する物質であるから、生体からの採取も不可能ではないが、病原体の汚染を避けるためにも、又、経済的にも、人為的に合成されるものを使用するのが好ましい。例えば、LIFのようなタンパク質性の分化抑制因子の場合、遺伝子操作によって製造される組換え分化抑制因子タンパク質を使用するのが好ましい。

15 抗酸化剤としては、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、アスコルビン酸などが使用可能であるが、通常は2-メルカプトエタノールを使用する。これらの物質は市販されており、容易に入手できる。

血清置換物は、これを無血清培養培地に添加することにより、多能性幹細胞の増殖を支持し得る物質を意味する。血清置換物は、単一物質であっても、混合物  
20 であってもよく、具体的にはアルブミン（例えば、ウシ血清アルブミン）又はアルブミン置換物（例えば、ウシ下垂体抽出物、コメ加水分解物、ウシ胎児アルブミン、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウシ胚抽出物、AlbuMAX I（登録商標））、アミノ酸（例えば、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェアラニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-グルタミン、  
25

L-アルギニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン)、  
ビタミン、トランスフェリン又はトランスフェリン置換物(例えば、エチレンジ  
アミンテトラ酢酸、エチレングリコールビス( $\beta$ -アミノエチルエーテル)-  
5 N,N,N',N'-テトラ酢酸、デフェロキサミンメシレート、ジメルカプトプロ  
パノール、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、トランス-1,2-ジアミノシク  
ロヘキサ-N,N,N',N'-テトラ酢酸のような鉄キレート物、クエン酸第2  
鉄キレート物、硫酸第1鉄キレート物などの鉄キレート化合物)、抗酸化剤(例  
例えば、還元型グルタチオン、アスコルビン酸-2-リン酸塩)、インスリン又  
10 はインスリン置換物(例えば、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、硫酸亜鉛などの  
亜鉛含有化合物)、コラーゲン前駆体(例えば、L-プロリン、L-ヒドロキシ  
プロリン、アスコルビン酸)及び微量元素(例えば、 $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$   
 $+Cd^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br^-$ 、 $I^-$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $F^-$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$ 、 $Zr^{4+}$ )  
15 から選択される1種又はそれ以上の成分を含有するものである。

なお、血清置換物の一例は、特表2001-508302号公報に「無血清真  
核生物細胞培養培地補充物」として詳記されており、当該公報の記載を参酌して  
血清置換物の組成を適宜に決定すればよい。代表的な血清置換物は、胚性幹細胞  
血清置換(KSR)として Invitrogen 社から販売されており、容易に入手可能  
20 である。

上記LIF、2-ME及びKSRは、培養培地中において、それぞれ通常、1  
~10000 unit/ml、1~1000  $\mu$ M、及び0.5~90% (v/v)の最終濃度、好ましくは100~1000 unit/ml、10~100  $\mu$   
M、及び5~20%の最終濃度となるような量で使用する。本発明の組成物及び  
25 これらの各添加成分は、培地に対して最初から目的の最終濃度となるような量で  
添加されてもよく、2回又はそれ以上の回数に分けて添加し、最終的に目的の濃  
度となるような量で使用されてもよい。培養培地は、通常、pHを重炭酸塩によ  
り7.0~8.2、好ましくは7.3~7.9に調節して使用される。

本発明の組成物及び培養培地は、それぞれ溶液形態又は乾燥形態に調製されて

よい。溶液形態の場合、濃縮組成物（例えば  $1 \times \sim 1000 \times$ ）として提供されてもよく、使用に際して、適宜に希釈されてもよい。溶液形態又は乾燥形態の組成物又は培養培地を希釈又は溶解するのに使用する液体の種類は、水、緩衝水溶液、生理食塩水溶液などがあり、必要に応じて容易に選択され得る。

5       好ましくは、本発明の組成物又は培養培地を滅菌して、コンタミネーションを防止する。滅菌方法には、紫外線照射、加熱滅菌、放射線照射及び濾過などがある。

10       本発明により、多能性幹細胞を培養して、分化能を保持したまま、未分化増殖を行うには、上記した本発明の培養培地、好ましくは細胞培養用最小培地に白血病阻害因子、抗酸化剤、血清置換物及び本発明組成物を含有させてなる培地を使用して、多能性幹細胞を、この分野で採用されている通常の培養条件下で培養すればよい。

15       多能性幹細胞は、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジを含む哺乳類、鳥類、爬虫類などの多様な動物に由来するものを使用し得るが、通常は、哺乳類に由来するものである。多能性幹細胞の具体例としては、ES細胞、EG細胞、EC細胞、APS細胞、MAP細胞などを挙げることができる。繁用される典型例は、マウスのES細胞である。培養する多能性幹細胞の数に特に限定はないが、本発明の培養方法は、特に1個の多能性幹細胞を培養して増殖させ、クローン細胞集団を  
20       形成させることを可能にする点で有利である。

25       培養すべき多能性幹細胞は、それ自体、支持細胞依存性のものでもよいが、支持細胞非依存性であるものが好ましい。支持細胞依存性多能性幹細胞を支持細胞非依存性にするには、次のように処理すればよい。すなわち、支持細胞を使用しない培養条件で、数次にわたる継代操作を行い、このような条件に適合した細胞を選択する。

      本発明による多能性幹細胞の培養方法における具体的な操作は、培養条件を含め、当該技術分野で常套の操作及び条件に従って、これを行うことができる。例えば、中辻憲夫編：実験医学別冊・ポストゲノム時代の実験講座4「幹細胞・クローン研究プロトコール」、羊土社（2001年）、Hogan, G. ら編：マウス胚

の操作：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY(1994)、Robertson, E. J. 編：奇形ガン及び胚性幹細胞、A Practical Approach, IRL Press Oxford, UK (1987) などの記載を参酌して適宜に決定することができる。

- 5        代表的な継代操作と培養条件を挙げれば、以下のとおりである。すなわち、E S細胞を継代するには、まず成育したE S細胞のコロニーをリン酸緩衝化生理食塩水（phosphate buffered saline：P B S）で1～2回リンスし、その後十分量のトリプシン－E D T A溶液（0.25%トリプシン－1 mM E D T A、P B S中）を細胞層を覆うように添加して5分間放置する。その後、トリプシン阻害剤を含むP B S又は血清を含むE S細胞培養用基礎培養液（C C M M + L I F + 2-ME）を添加し、ピペッティングにより細胞塊を分離する。この細胞懸濁液から、通常遠心分離により細胞を沈殿させる。上清を除去後、沈殿した細胞を血清又は血清置換物を含むE S細胞培養用基礎培養液に再懸濁し、この一部を支持細胞層又はゼラチン化したプラスチックプレート内に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。
- 10
- 15

- 本発明方法の一つの実施態様として、0.1%（w/v）ゼラチン溶液で処理してゼラチン化したプラスチックプレート内に37℃に温めた本発明の培養培地を入れ、そこにプレート面積1 cm<sup>2</sup> 当り10～1000個の多能性幹細胞を播く。プレートをCO<sub>2</sub> インキュベーター内に置き、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。コロニーが成育したら（例えば、E14tg2a細胞では7日以内）、新しい培地に播き直し、継代する。継代に際しては、トリプシン阻害剤を含むP B Sを使用することが望ましい。
- 20

- 近接する多能性幹細胞同士の相互作用により当該多能性幹細胞の未分化増殖が誘導されるよりも低密度な播種条件とは、具体的には、細胞1個/mm<sup>2</sup> 以下の播種条件などが好適なものとして例示される。均一な多能性幹細胞系統の樹立や、遺伝子操作を行った多能性幹細胞の増殖に際し、1つの多能性幹細胞からそのクローン細胞集団を得る工程などは、勿論この条件に該当する。
- 25

本発明の好ましい実施態様においては支持細胞や血清が使用されないから、通常の培養方法で行われる血清のロットのスクリーニング、支持細胞の選択及び培

養を省くことができる。また、本発明による成分が明らかな培養培地を使用した場合、ゼラチンコートプレート上で低密度播種条件下に単一の支持細胞非依存性多能性細胞を未分化状態で増殖させることが可能である。

なお、本発明は、支持細胞と血清を使用しない細胞培養培地に添加することにより、多能性幹細胞の未分化増殖を可能ならしめるような物質のスクリーニング方法をも提供する。すなわち、細胞培養用最小培地に白血病阻害因子、血清置換物、抗酸化剤及び候補物質を添加してなる培養培地を使用して、支持細胞非依存性の多能性幹細胞（例えばマウスのES細胞）を培養し、当該多能性幹細胞の未分化コロニーの生成の有無を確認し、顕著な陽性を示すものを本発明により選択するものである。

未分化コロニーの形成は、例えばライシュマン（Leishman）染色を含むタンパク質染色を使用して形態的に確認できる。また、アルカリフォスファターゼ、SSEA-1、3、4抗原などの未分化細胞マーカーの存在を抗体で確認することも可能である。さらに、Oct-3/4遺伝子やRex-1遺伝子の発現も、未分化細胞に特徴的であるから、確認手段として採用されてもよい。通常は、これらの方法を複数組合せて未分化であることを確認する。

上記スクリーニング法を実施する場合の標準培養培地の組成と培養条件は次のとおりである：

標準培養培地の組成：

GMEM、10%KSR、 $10\mu\text{M}$ 2-ME、 $1000\text{U}/\text{ml}$  LIF、  
0.1mM非必須アミノ酸、1mMピルビン酸ナトリウム

培地に播種する多能性幹細胞の数：

培養面積 $1\text{cm}^2$  当り培養液 $1\text{ml}$ を使用し、100個を播種する。

培養条件： $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$

確認及び観察手段：

7日後に培地を観察し、多能性幹細胞の未分化コロニーの数（ $/1\text{cm}^2$ ）により、次のとおり判定する：

未分化コロニーの数（ $/\text{cm}^2$ ）	判定
0	—
1～5	+1



6～10	+2
10以上	+3

本発明の培養方法によって、1個の多能性幹細胞を培養して増殖させ、クローン細胞集団を形成させることができる。このことは、ゲノムを改変した多能性幹細胞の集団が必要な場合、例えばトランスジェニック動物を作成する場合に、有利である。

- 5 多能性幹細胞の代表例であるES細胞を培養するための培地としては、従来、細胞培養用最小培地に、(1)白血球阻害因子、(2)血清、(3)2-メルカプトエタノール、(4)支持細胞を添加したものが使用されてきた。ただし、(1)～(3)が含有されている場合には、(4)の存在は必須ではなく、ゼラチンでコートしたプレート上に支持細胞非依存性ES細胞を直接付着させて培養
- 10 することも可能である。また、(4)の存在を前提とした場合、(2)を(5)血清置換物で置換することができ、血清自体を使用しないES細胞の培養が可能となる。本発明は、このような血清が使用されない培地に対し、さらに(6)アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を添加することにより、(4)支持細胞の不
- 15 存在下にES細胞を培養することを可能ならしめた。
- 以上、本発明は、「アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件」が、培地に対してアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を添加又は配合する場合を例に挙げて説明されたが、そのような条件を他の適宜の方法で作りだすことも可能である。例
- 20 えば、多能性幹細胞におけるアデニル酸シクラーゼ遺伝子の発現を抑制する方法(例えばmRNAやRNAiを使用)や、遺伝子操作でアデニル酸シクラーゼ活性を阻害する分子を発現させる方法(例えば拮抗型変異体を使用)が採用されてもよい。

- 本発明の別の態様では、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の少なくとも1種を含有する、多能性幹細胞培養用の培地補充物が提供される。好ましくは、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質は、SQ22536(9-(テトラヒドロ-2-フラニル)-アデニン)、2',5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート及びMDL-12,330A(シス
- 25

ーNー（2－フェニルシクロペンチル）アザシクロトリデセー1－エン－2－アミン）からなる群から選択されるか、あるいは副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド（PACAP）並びにそれらと実質的に同様の生理活性を有するペプチドから選択される。

本発明のさらなる態様では、上記の培地補充物を含む、多能性幹細胞培養用の培地が提供される。好ましくは、該培地は、支持細胞及び／又は血清を含まず、より好ましくは、該培地は、支持細胞及び血清を含まない。該培地は、細胞培養用最小培地を基礎培地とすることができる。該培地は、さらに分化抑制因子、血清置換物及び抗酸化剤を含んでもよい。

本発明の他の態様では、多能性幹細胞を培養して未分化多能性幹細胞を増殖させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、多能性幹細胞の培養方法が提供される。本方法では、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものであり得る。また、該培養を上記の培地で行うことができる。本方法では、1個の多能性幹細胞を培養してそのクローン細胞集団を得ることができ、また、支持細胞及び／又は血清が存在せず、かつ、上記の培地補充物が存在しない条件下では未分化増殖を起こさない多能性幹細胞を、上記の培地で培養してそのクローン集団を得ることができる。好ましくは、本方法では1個の多能性幹細胞を上記の培地で培養してそのクローン集団を得る。本方法では、多能性幹細胞は、ES細胞であり得、また、多能性幹細胞は哺乳類由来のものであり得る。さらに、多能性幹細胞はヒト由来でもよい。

本発明のさらなる態様では、上記の培養方法で増殖させた、多能性を保持する未分化多能性幹細胞が提供される。

本発明の別の態様では、多能性幹細胞を培養して未分化多能性幹細胞を樹立させるにあたり、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、多能性幹細胞の培養方法が提供される。本方法では、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものであり得る。また、該培養を上記の培地で行うことができる。本方法で

は、多能性幹細胞は、ES細胞であり得、また、多能性幹細胞は哺乳類由来のものであり得る。さらに、多能性幹細胞はヒト由来でもよい。

本発明のさらなる態様では、上記の培養方法で樹立させた、多能性を保持する未分化多能性幹細胞が提供される。

- 5        以下の実施例は、そのような血清も支持培地も使用しない、すべて明らかな成分で調製された培地により、ES細胞を培養することが可能であることを証明するものである。本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 実施例 1

- 10        細胞培養最小培地として、グラスゴウ最少必須培地 (Glasgow minimum essential medium: GMEM; Sigma 社) を使用し、これに (1)  $1 \times 10^3$  U/ml LIF (ESGRO, Invitrogen 社)、(3)  $0.1 \mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール (ナカライテスク社)、(5) 10% (v/v) KSR

- (Invitrogen 社) を添加した培養液 1 ml で、100 個の支持細胞非依存性 ES 細胞 (E14tg2a (Hooper, M. et al., Nature, 325, 292 (1987))、CGR8 (Mountford, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4303 (1994)) 及びそれから派生した ES 細胞) を、0.1% (w/v) ゼラチン溶液で処理して、ゼラチン化した 12 ウェルプレート の 1 ウェル内で、37°C、5%  $\text{CO}_2$  下で培養した。

- 20        培養 5 日目以降に、培養液を吸引除去後、プレート面を覆う量のライシュマン (Leishman) 染色液 (1.5 g Leishman Staining: Sigma 社/Lメタノール) を加え、室温で 10 分間保持し、水洗した (ライシュマン染色)。青染したコロニーを肉眼又は光学顕微鏡で観察した結果、形態的に未分化状態を維持したコロニーの形成は、全く認められなかった (図 1 (g))。この組成の培養液に、
- 25        さらに (2) 0.3% (v/v) FCS を添加して培養すると、平均 17 個の未分化コロニー形成が認められた (図 1 (d))。このことから、(1) + (3) + (5) の組成では、(2) FCS に含まれる未分化コロニー形成に必要な成分が欠如していると考えられた。また、同じ培養液組成 ((1) + (3) + (5)) で、ウェル当り 1000 個以上の ES 細胞を培養すると、未分化コロニ

一の形成が認められた。この高密度培養上清（conditioned medium：CM）を最終濃度10%（v/v）で培養液に添加して、ウェル当り100個のES細胞を培養すると、平均7個の未分化コロニーの形成が認められた（図1（f））。このことは、ES細胞自身が未分化コロニー形成に必要な成分を分泌していることを示す。

そこで、種々の既知成長因子、サイトカイン、ペプチドホルモンなどから選択された候補ペプチドを（1）＋（3）＋（5）を含む培地に添加し、ES細胞を37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養して、その未分化コロニー形成能を観察した。その結果、1μM副腎皮質刺激ホルモン、1μM脳ナトリウム利尿ペプチド及び1μM下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドを添加した培地において、形態的に明らかなES細胞の未分化コロニーの形成が認められた（図1（e）；ペプチドとしてACTHを使用）。なお、図1（a）～（c）は、GMEMとLIFと2-MEからなる培地にそれぞれFCS＋支持細胞、KSR＋支持細胞及びFCSを添加した場合を示す。

これらのペプチドホルモンの補充によって未分化コロニーを形成したES細胞では、未分化状態のマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性染色試験で陽性であり（図1）、未分化細胞特異的に発現する転写因子Oct-3/4の発現も、相同遺伝子組換え法で導入したレポーター遺伝子の活性により確認された。従って、これらのペプチドは、FCSやCMのように未分化コロニー形成支持能を有するものと理解される。

## 実施例2

上記実施例1において、試験した候補ペプチドのうちで最も低濃度で活性を示したACTH及びそのフラグメントを用いて、その有意性を検討した。上記同様、細胞培養最小培地に（1）LIF、（3）2-ME及び（5）KSRを添加した培養培地に、ACTH又はそのフラグメントを最終濃度1μMで添加したとき、ACTH（1-39）、ACTH（1-24）、ACTH（11-24）は活性を示したが、ACTH（18-39）は活性を示さなかった。また、活性を示したもののうちではACTH（1-24）が最も強い活性を示し、最終濃度0.1

$\mu\text{M}$ でも未分化コロニー形成を支持した。また、 $10\mu\text{M}$  ACTH (1-24) を添加した条件での未分化コロニー形成率及び細胞増殖速度は、 $0.3\%$  FCSもしくは $10\%$  CM添加時と同等であった。

以上の結果から、基礎培地としての細胞培養最小培地に、(1) LIF、  
5 (3) 2-ME、(5) KSR + (6) ACTH等のペプチドホルモンを添加したものは、血清や支持細胞がなくとも、多能性を維持した未分化状態でES細胞を増殖させることが可能であることが理解できる。

### 実施例 3

10 ACTHが細胞内にどのようなシグナルを伝達する結果、血清や支持細胞の非存在下で多能性を維持した未分化状態でES細胞を増殖させるのかを解明するために、各種シグナル伝達阻害物質を培地に添加して、ES細胞の増殖を観察した。

ACTHは、Gタンパク質共役受容体ファミリーに属するACTH受容体を活性化し、ACTH受容体は、 $G_{\alpha}$ サブユニットを含む三量体Gタンパク質の活性化を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。そこで、  
15 (1)  $1 \times 10^3 \text{ U/ml}$  LIF、(3)  $0.1\mu\text{M}$  2-ME、(5)  $10\%$  (v/v) KSR、及び(6)  $10\mu\text{M}$  ACTHを添加した細胞培養最小培地に、さらにアデニル酸シクラーゼ阻害剤である(7) SQ22536 (9-(テトラヒドロ-2-フランリ)-アデニン) (Sigma)  $100\mu\text{M}$ を添加し、その  
20 培地を使用して実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、予想に反して培養7日目の未分化コロニーの形成は全く阻害されず、むしろ個々のコロニーが顕著に大きくなった。

SQ22536単独の効果を調べるために、(1)  $1 \times 10^3 \text{ U/ml}$  LIF、(3)  $0.1\mu\text{M}$  2-ME、(5)  $10\%$  (v/v) KSR、及び(7) SQ22536  $100\mu\text{M}$ を添加した細胞培養最小培地を使用して、実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、ACTHを添加した場合と同様に、平均  
25 9個の未分化コロニーの形成が認められた。また、SQ22536の代りに、別のアデニル酸シクラーゼ阻害剤である2',5'-ジデオキシアデノシン (Sigma)  $500\mu\text{M}$ を添加した培地を使用しても、平均8個の未分化コロニーの形成が認

められた。これらの結果から、アデニル酸シクラーゼ活性の抑制が、未分化コロニー形成を導くことが明らかになった。

Gタンパク質共役型受容体によるアデニル酸シクラーゼの抑制は、通常、リガンド結合による $G_{\alpha_i}$ サブユニットを含む三量体Gタンパク質の活性化を介して起こる。ACTHの効果がこのシグナル伝達経路を介するものであるか否かを確認するために、(1)  $1 \times 10^3$  U/ml LIF、(3)  $0.1 \mu\text{M}$  2-ME、(5) 10% (v/v) KSR、及び(6)  $10 \mu\text{M}$  ACTHを含む細胞培養最小培地に、 $G_{\alpha_i}$ の阻害剤である百日咳毒素を最終濃度 $100 \text{ ng/ml}$ で添加し、その培地を使用して実施例1と同様にES細胞を培養した。その結果、ACTHの効果が抑制され、未分化コロニーの大きさが著しく減少した。このことは、ACTHの未分化コロニー形成支持効果が、 $G_{\alpha_i}$ の活性化を介することを示す。また、ACTH受容体は $G_{\alpha_s}$ と共役するので、ES細胞においてはACTHはその特異的受容体とは異なるGタンパク質共役型受容体と結合することが示唆される。

以上の結果から、ACTHによる未分化コロニー形成支持作用は、以下のシグナル伝達経路を通じて起こることが判明した。① $G_{\alpha_i}$ と共役するGタンパク質共役型受容体にACTHが結合し、② $G_{\alpha_i}$ が活性化され、そして③アデニル酸シクラーゼの活性が抑制される。従って、血清及び支持細胞を含まない培地中でES細胞を未分化のまま増殖させるためには、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する方法であれば、どのような方法を採用してもよいことが理解できる。

#### 実施例4

上記実施例1において、 $1 \text{ nM}$ 副腎皮質刺激ホルモンを使用して培養して得られた未分化コロニー由来のES細胞を、さらに2回継代した後、これらをマウスの胚盤胞に注入し、偽妊娠雌マウス子宮に移植した。その結果、100個の移植胚から33匹の産仔が得られ、30匹が生後3週以降も生存していたが、これらのうち17匹は毛色上70%以上のES細胞寄与率を示す良好なキメラマウスであった。またこの17匹のうち14匹は雄であり、所謂 male distortion が確認され、それらの交配実験により、生殖細胞系列へのES細胞の寄与が確認され

た。このことから、本培養条件が、ES細胞の多能性を維持するのに十分であることが証明された。

#### 実施例 5

- 5 C57BL/6純系マウスから受精後3.5日の胚盤胞期胚30個を採取し、これから免疫手術法によって単離した内部細胞塊を、それぞれfibronectinでコートしたプレート内で、CCMM、(1)  $1 \times 10^3$  U/ml LIF、(3)  $0.1 \mu\text{M}$  2-ME、 $0.1 \text{ mM}$  非必須アミノ酸、 $1 \text{ mM}$  ピルビン酸ナトリウム、(5) 10% (v/v) KSR及び(6)  $10 \mu\text{M}$  ACTHからなる培養
- 10 液で培養した。この結果、少なくとも2つの内部細胞塊は増殖を開始し、最終的にES細胞株として樹立されるに至った。これにより、この培養法が既に樹立されたES細胞の培養のみならず、新たなES細胞株の樹立にも有用であることが証明された。

## 請求の範囲

1. アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の少なくとも1種を含有する、多能性幹細胞培養用の組成物。

2. 培地補充物である、請求項1記載の組成物。

5 3. 多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ、多能性幹細胞を増殖させるための、請求項1又は請求項2記載の組成物。

4. アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質が、SQ 22536 (9-(テトラヒドロ-2-フラン)-アデニン)、2',5'-ジデオキシアデノシン、9-シクロペンチルアデニン、2',5'-ジデオキシアデノシン3'-ジホスフェート、  
10 2',5'-ジデオキシアデノシン3'-モノホスフェート及びMDL-12,330A (シス-N-(2-フェニルシクロペンチル)-アザシクロトリデセ-1-エン-2-アミン) からなる群から選択される、請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の組成物。

5. アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質が、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、  
15 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 及び下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) 並びにそれらと実質的に同様の生理活性を有するペプチドから選択される、請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の組成物。

6. 請求項1ないし請求項5のいずれかに記載の組成物を含む、多能性幹細胞培養用の培地。

20 7. 支持細胞及び／又は血清を含まない、請求項6に記載の培地。

8. 支持細胞及び血清を含まない、請求項6に記載の培地。

9. 細胞培養用最小培地である、請求項6ないし請求項8のいずれかに記載の培地。

10. さらに分化抑制因子、血清置換物及び抗酸化剤を含む、請求項6ないし請求項9のいずれかに記載の培地。  
25

11. 多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ、多能性幹細胞を増殖又は樹立するための多能性幹細胞の培養方法であって、当該培養をアデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、方法。

12. アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シクラーゼ活性



抑制物質の使用を伴うものである、請求項 1 1 記載の培養方法。

1 3. 培養を請求項 6 ないし請求項 1 0 のいずれかに記載の培地で行う、請求項 1 1 又は請求項 1 2 記載の培養方法。

5 1 4. 多能性幹細胞が E S 細胞である、請求項 1 1 ないし請求項 1 3 のいずれかに記載の培養方法。

1 5. 多能性幹細胞が哺乳類由来のものである、請求項 1 1 ないし請求項 1 4 のいずれかに記載の培養方法。

1 6. 多能性幹細胞がヒト由来のものである、請求項 1 5 に記載の培養方法。

10 1 7. アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下に未分化状態の多能性幹細胞を培養することを特徴とする、未分化状態の多能性幹細胞クローン集団の調製方法。

1 8. 生体から未分化状態の多能性幹細胞を単離し、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件下に未分化状態の多能性幹細胞を培養することを特徴とする、未分化状態の多能性幹細胞クローン集団の調製方法。

15 1 9. アデニル酸シクラーゼ活性を抑制する条件がアデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用を伴うものである、請求項 1 7 又は請求項 1 8 記載の調製方法。

2 0. 培養を請求項 6 ないし請求項 1 0 のいずれかに記載の培地で行う、請求項 1 7 ないし請求項 1 9 のいずれかに記載の調製方法。

20 2 1. 1 個の多能性幹細胞を培養してそのクローン集団を得る、請求項 1 7 ないし請求項 2 0 のいずれかに記載の調製方法。

2 2. 近接する多能性幹細胞同士の相互作用により当該多能性幹細胞の未分化増殖が誘導されるよりも低密度な播種条件にある多能性幹細胞を、請求項 7 又は請求項 8 に記載の培地で培養してそのクローン集団を得る、請求項 1 7 ないし 2 1 のいずれかに記載の調製方法。

25 2 3. 1 個の多能性幹細胞を請求項 7 又は請求項 8 に記載の培地で培養してそのクローン集団を得る、請求項 1 7 ないし請求項 2 2 のいずれかに記載の調製方法。

2 4. 多能性幹細胞が E S 細胞である、請求項 1 7 ないし請求項 2 3 のいずれかに記載の調製方法。

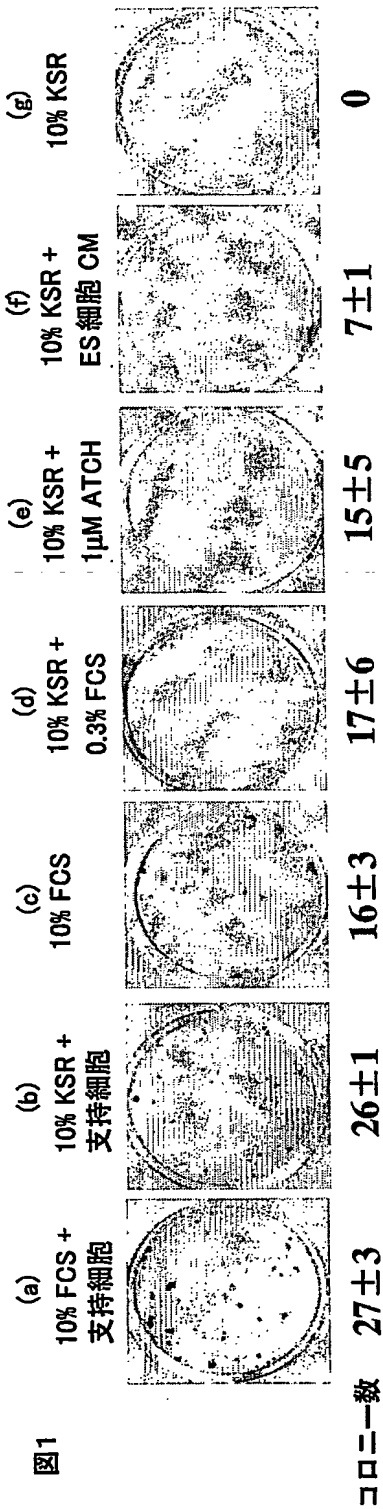
25. 多能性幹細胞が哺乳類由来のものである、請求項17ないし請求項24のいずれかに記載の調製方法。

26. 多能性幹細胞がヒト由来のものである、請求項17ないし請求項25のいずれかに記載の調製方法。

5      27. 請求項17ないし請求項26のいずれかに記載の調製方法で得られる、未分化多能性幹細胞クローン集団。

28. 多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ培養し、多能性幹細胞を増殖又は樹立させるための、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質の使用。

10      29. 多能性幹細胞の未分化状態を維持させつつ培養し、多能性幹細胞を増殖又は樹立させるための、アデニル酸シクラーゼ活性抑制物質を含有する組成物の使用。



単一コロニーの形態



アルカリホスファターゼ染色

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/14009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/02, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/02, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	PESCE, M. et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells, Development, 1996, Vol.122, No.1, pages 215 to 221	1-3, 5-17, 19-29/4
X/A	DE FELICI, M. et al., Regulation of primordial germ cell development in the mouse, Int.J.Dev. Biol., 2000, Vol.44, pages 575 to 580	1-3, 5-17, 19-29/4
X/A	WO 90/01541 A (AMARAD CORP. LTD.), 22 February, 1990 (22.02.90), & AU 8940590 A & EP 380646 A & DK 9100170 A & NO 9100385 A & JP 3-503241 A & US 5166065 A	27/1-17, 19-26, 28-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 November, 2003 (26.11.03)	Date of mailing of the international search report 09 December, 2003 (09.12.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14009

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIPSKAIA, L. et al., Adenylyl cyclase activity and gene expression during mesodermal differentiation of the P19 embryonal carcinoma cells, J.Cell.Physiol., 1998, Vol.176, No.1, pages 50 to 56	1-17,19-29
A	DENG, W. et al., In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP, Biochem.Biophys.Res. Commun., 2001, Vol.282, No.1, pages 148 to 152	1-17,19-29
A	CHEN, T.C. et al., Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas, Lab.Invest., 1998, Vol.78, No.2, pages 165 to 174	1-17,19-29
A	MARCHAL, S. et al., Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway, Exp.Cell.Res., 1995, Vol.220, No.1, pages 1 to 10	1-17,19-29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14009

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18 and the parts relating to claim 18 in claims 19 to 27

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions described in claim 18 and the parts relating to claim 18 in claims 19 to 27 involve a step of "isolating undifferentiated multipotent stem cells from a living body", thus pertain to methods for treatment of the human body by surgery and relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. C12N5/02, C12N5/06

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. C12N5/02, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN),  
JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	PESCE, M. et al., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells, Development, 1996, Vol.122, No.1, pp.215-221	1-3, 5-17, 19-29/4
X/A	DE FELICI, M. et al., Regulation of primordial germ cell development in the mouse, Int J Dev Biol, 2000, Vol.44, pp.575-580	1-3, 5-17, 19-29/4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
26.11.03

国際調査報告の発送日  
09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
七條 里美



4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 90/01541 A (AMRAD CORP LTD) 1990.02.22 & AU 8940590 A & EP 380646 A & DK 9100170 A & NO 9100385 A & JP 3-503241 A & US 5166065 A	27/1-17, 19-2 6, 28-29
A	LIPSKAIA, L. et al., Adenylyl cyclase activity and gene expression during mesodermal differentiation of the P19 embryonal carcinoma cells, J Cell Physiol, 1998, Vol.176, No.1, pp.50-56	1-17, 19-29
A	DENG, W. et al., In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP, Biochem Biophys Res Commun, 2001, Vol.282, No.1, pp.148-152	1-17, 19-29
A	CHEN, T. C. et al., Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas, Lab Invest, 1998, Vol.78, No.2, pp.165-174	1-17, 19-29
A	MARCHAL, S. et al., Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway, Exp Cell Res, 1995, Vol.220, No.1, pp.1-10	1-17, 19-29



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 18及び請求の範囲19-27のうち請求の範囲18に関する部分は、  
この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲18及び請求の範囲19-27のうち請求の範囲18に関する部分に記載された発明は、「生体から未分化状態の多能性幹細胞を単離」する工程を包含するものであり、人の身体の手術による処置に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。